

풋마름병균, *Ralstonia solanacearum*의 길항세균 SKU-78 균주의 분리 동정 및 특성

성필제 · 신정균¹ · 조홍범 · 김신덕*

서경대학교 생물공학과, ¹한국바이오테크놀로지

Isolation, Identification and Biological Control Activity of SKU-78 Strain against *Ralstonia solanacearum*

Pil-Je Sung, Jeong-Kun Shin¹, Hong-Bum Cho and Shin-Duk Kim*

Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

¹Korea Biochemical Co, Uiryoung 636-800, Korea

Received January 12, 2005; Accepted March 7, 2005

Six stains of plant growth promoting rhizobacteria were selected through germinating seed assay and root colonization assay. Among them, SKU-78 strain induced significant suppression of bacterial wilt disease in tomato and pepper plants. Seed treatment followed by soil drench application with this strain resulted in over 60% reduction of bacterial wilt disease compared with the control. It was suggested that SKU-78 strain activated the host defense systems in plants, based on lack of direct antibiosis against pathogen. According to Bergey's Manual of Systemic Bacteriology and 16S rDNA sequence data, SKU-78 stain was identified as *Bacillus* sp. SKU-78.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt disease, PGPR, ISR, biocontrol agent

서 론

*Ralstonia solanacearum*은 감자, 토마토, 고추, 담배, 바나나 등 200여종의 작물에 풋마름병(청고병, bacterial wilt)을 유발시켜 막대한 경제적 손실을 초래하는 식물 병원균으로 기주범위에 따라서 5개 race로 구분된다. Race 1은 토마토, 담배, 가지, 고추 등 대다수 가지과 작물 및 잡초, race 2는 바나나, race 3은 감자와 토마토, race 4는 뽕나무, race 5는 생강 등에 침입한다고 알려졌으며, 그중에서 race 1에 의한 발병이 가장 많이 보고 되었으나, race 3에 의한 피해도 점차 증가되고 있다.^{1,2)} 풋마름병은 고온 다습한 상태에서 발병이 잘 이루어져 주로 열대와 아열대의 따뜻한 지역을 중심으로 피해가 속출하였으나, 근래에는 온대기후 지역에서도 자주 발병되어 그 피해가 점점 심각해지고 있다. 우리나라의 경우는 불과 5-6년 전까지만 해도 크게 문제되지 않았으나 최근 기온의 상승 등 여러 원인에 의해 발생이 빈번해져 피해가 막대해졌다.

풋마름병 병원균인 *R. solanacearum*은 이식과 증경 또는 토양 선충 등에 의해 상처 난 식물의 뿌리나 2차근이 생기는 부위를 통해 침입하여 뿌리의 피질에서 집락을 형성하여 도관을

타고 번식함으로써 양분과 수분의 통로를 막아 식물을 고사시킨다.³⁾ 풋마름병균의 방제 방법으로는 벼 재배를 이용한 윤작 또는 가지과 작물이 아닌 작물들을 돌려짓기 하여 토양 내 *R. solanacearum*의 밀도를 낮추거나, 훈증제에 의한 토양 소독방법, 그리고 농용 항생제 등의 약제처리 등이 있으나 풋마름병균은 기주식물 없이도 토양이나 물 속에서 5년 까지 생존이 가능하기 때문에⁴⁾ 경종적 방제법 만으로는 방제가 어려우며, 또한 토양소독 방법은 방제 효과가 뛰어나나 경제적인 문제가 있고, 농용 항생제의 사용은 항생제 내성 증가의 문제가 있으며, 유기합성 농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며, 오랫동안 보관이 가능하다는 장점이 있지만 지하수 및 토양오염, 농산물중의 잔류독성 그리고 생태계 파괴 등의 문제가 있다. 더구나 풋마름병균은 식물체의 도관조직 속에서 증식하므로 약제의 경엽 살포로는 조직 속까지 약효가 미치지 못하여 효과를 기대할 수 없기 때문에, 토양처리에 의해 병원균의 생존 자체를 불가능하게 하거나, 생존하더라도 활동하지 못하도록 환경조건을 개선하고 저항성 품종의 개발과 더불어 길항미생물을 이용한 생물학적 방제가 시급한 실정이나 풋마름병의 생물학적 방제는 아직 초보적인 단계이다. 식물생장을 촉진시켜 plant growth promoting rhizobacteria(PGPR)로 지칭되는 근권 미생물이 초기에는 수확량을 늘리기 위해 사용되었으나 PGPR 균주들은 (1) 항생물질 생산에 의한 antibiosis (2) sideropher 생산에 의한 Fe 이온에 대한 경쟁 (3) 식물 뿌리 표면의 colonization 경쟁 (4)

*Corresponding author

Phone: 82-2-940-7171; Fax: 82-2-919-0345

E-mail: sdkim@skuniv.ac.kr

분해효소생산 (5) 기주 방어 체계(host defense system)의 활성화 (6) 식물생장 촉진효과로 병원균에 대한 노출시기 단축 등의 여러 복합적인 기작에 의해 식물병원균의 발병을 억제함이 알려져^{5,6)} 최근에는 토양 유래 병원균(soil borne pathogen)의 발병을 억제하는 생물농약으로의 개발 가능성이 크게 부각되고 있다.⁷⁾

본 연구에서는 고추와 토마토 근권에서 분리한 미생물 중에서 종자발아 실험과 뿌리 집락형성 실험(colonization assay) 방법에 의해 선발된 PGPR 균주 6종에 대해 포트실험을 실시하여, 종자처리와 토양처리 모두에서 뛰어난 풋마름병 방제효과를 나타낸 SKU-78 균주에 대해서 포장실험을 실시하여 풋마름병 방제제로의 개발 가능성을 확인하였고, 16S rDNA 염기서열 분석과 생화학적 특성조사를 통해 SKU-78 균주를 *Bacillus* sp. SKU-78로 동정하였다.

재료 및 방법

병원균 확보 및 배양. 본 실험에서 사용된 *R. solanacearum* 은 농업과학기술원에서 분양받은 균주와 풋마름병에 감염된 고추와 토마토에서 분리한 균주를 사용하였다. 시험균주는 20% glycerol을 포함하는 tryptic soy broth(TSB, Difco)에 고정하여 -80°C에 보관하면서, 0.005% tetrazolium chloride(TZC) 평판배지에 28°C에서 2일간 배양하여 실험에 사용하였다.

근권 미생물의 분리. 여주와 이천 지역의 하우스에서 재배한 고추와 토마토 근권 토양에서 미생물을 분리하였다. 멸균된 핀셋을 이용하여 뿌리에서 떨어진 흙 1g를 멸균수로 진탕 후 정지하여 상등액 1ml를 취해 순차적으로 희석하여 일정량의 희석액을 TSA(tryptic soy agar, Difco) 평판 배지에 도말하여 30°C에서 2일간 배양하여 single colony를 분리하였다. 분리한 colony는 TSB(tryptic soy broth) 배지로 30에서 24시간 배양한 다음 6,000×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 멸균수에 현탁하여 600 nm에서 OD = 1(10⁹ cfu/ml)로 맞추어 그대로 또는 희석하여 실험에 사용하였다.

Germinating seed assay. 고추(부강 품종)와 토마토(서광 품종) 종자를 구입하여 2% sodium hypochlorite 용액으로 2분간 처리하여 표면 살균한 후 멸균수로 여러 번 행구어 사용하였다. 1% water agar plate에 고추 또는 토마토 종자를 올려놓고 각 종자 주위에 열배로 희석한 균체 현탁액 1ml씩 점적한 후, 28°C 생장고에서 뿌리 성장과 뿌리 주위의 균주의 집락형성을 10일간 관찰하였다. 대조군의 경우는 균체 현탁액 대신 멸균된 TSB를 종자 주위에 처리하였다. 각 처리 당 종자 6개씩 3번 반복실험 하였다.

종자 처리. Ownley 방법에 의해 선발 균주를 토마토와 고추 종자에 처리하였다.⁸⁾ TSB 배지를 이용하여 선발균주를 30°C에서 24시간 배양한 후 6,000×g에서 15 분간 원심분리하여 회수한 균체를 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 용액에 현탁시킨 후 동량의 2% methylcellulose(Sigma, St. Louis)를 첨가한 박테리아 현탁액을 종자와 잘 혼합하여 무균상태로 실온에서 건조시키는 방법으로 종자에 박테리아를 코팅하였다.

포트실험. 선발균주에 의한 풋마름병 발병 억제효과는 종자

처리와 토양관주 2가지 방법으로 검정하였다. 지름 10 cm 포트에 바로커 상토(한국농자재 주식회사)를 180 g 채우고 박테리아를 코팅한 종자와 코팅하지 않은 종자들을 각각 파종한 다음 25-35°C로 유지되는 하우스에서 재배하여 4엽기가 되었을 때 칼로 뿌리에 상처를 내고 *R. solanacearum* 현탁액 30 ml(10⁷ CFU/ml)을 관주처리 하여 발병을 유도하였다. 토양처리 방법은 종자를 파종한 후 고추와 토마토가 4엽기가 되었을 때 선발균주 현탁액을 포트 당 30 ml(10⁹ CFU/ml)씩 분주하고, 이를 후 뿌리에 상처를 낸 다음 *R. solanacearum* 현탁액을 30 ml(10⁷ CFU/ml)씩 관주하였다. 종자 처리만 행한 경우와 토양처리만 행한 경우 및 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 있어서 선발된 PGPR 균주에 의한 발병 억제효과를 4 주간 관찰하였다. 대조구는 선발균주 처리 없이 *R. solanacearum* 현탁액 만 처리하였으며, 각 처리 당 10본 씩 3회 반복 실험하였다. 풋마름병 발병률은 식물이 아주 싱싱한 경우는 0, 잎이 약간 시든(25% 미만) 경우는 1, 중간정도(50% 미만) 시든 경우는 2, 심하게(75% 정도) 시든 경우는 3, 완전히 시들어 고사한 경우를 4로 등급을 정하였으며, 발병 억제율은 {(대조구의 발병률-처리구의 발병률)/대조구의 발병률}×100으로 계산하였다.

포장실험. 풋마름병이 발병한 경남 고성군의 방울토마토(TM8) 재배 하우스에 선발균주 현탁액을 2차에 걸쳐 처리하고 처리에 따른 토양의 *R. solanacearum* 밀도의 변화 및 풋마름병의 회복 여부를 조사하였다. 선발 균주 현탁액 1차 처리 시에는 40배 희석한 균체 현탁액을 토양 처리하였으며, 그로부터 10일 후 200배 희석한 균체 현탁액을 2차로 처리하였다.

선발 균주의 동정. 선발 균주의 동정을 위하여 형태학적, 배양적 특성 및 생화학적 특성을 Manual of Methods for General Bacteriology와 Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology에 의거하여 결정하였다. 세포와 포자의 형태, catalase, oxidase, urease, protease, lipase, nitrate reductase, amylase와 cellulase 등의 여러 효소의 생산 여부, 탄소원의 이용, citrate 이용, Voges-Prokauer 반응 등을 조사하였다. 또한 16S rDNA 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 분석하였다.

결 과

활성균주의 분리. TSA 평판 배지를 이용하여 고추와 토마토 근권에서 분리한 총 161종의 미생물 중에서 대조구에 비해 10% 이상의 뿌리 성장 촉진 효과를 보이면서 뿌리 주위 agar에 뿌얇게 집락형성이 이루어지는 6개 균주, SKU-7, SKU-65, SKU-78, SKU-132, SKU-134, SKU-155를 선발하였다(Table 1).

선발균주에 의한 발병 억제 효과. 1) 포트 실험: 뿌리 성장 촉진 효과와 뿌리에 집락형성 여부를 확인하는 실험을 통해 선발된 6개 활성균주의 발병억제 효과를 검정하기 위해 종자처리, 토양처리, 종자와 토양 병행 처리를 포트실험으로 행하였다. Ownley 방법으로 박테리아를 종자에 코팅한 경우 종자 당 10⁸-10⁹ CFU의 미생물 밀도가 유지됨이 serial dilution plating에 의해 확인되었으며, 2% methylcellulose와 0.02 M phosphate buffer 혼합액만으로 처리한 대조군에서는 박테리아가 검출되지

Table 1. Effects of the selected plant growth promoting rhizobacteria strains on root elongation of pepper plant

Strains	SKU-7	SKU-65	SKU-78	SKU-132	SKU-134	SKU-155
Root elongation rate (%)	10.3	10.2	17.2	10.3	17.2	10.8

Mean root length in millimeters was measured at 10 days after treatment. An equal number of plants was treated with sterile distilled water as control. Root elongation rate = {(root length of treatment group-root length of control)/root length of control} × 100

Table 2. Suppression of bacterial wilt of tomato and pepper plants by PGPR strains

Strains	Biocontrol efficacy (%) ^a					
	Seed treatment ^b		Soil application ^c		Seed + Soil treatment	
	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato
SKU-7	17.6	10.3	37.5	20.3	52.3	50.5
SKU-65	23.5	15.4	35.0	15.2	50.1	49.7
SKU-78	41.2	28.2	47.5	30.8	69.4	62.5
SKU-132	35.3	23.1	42.5	25.9	59.3	42.1
SKU-134	41.2	15.4	42.5	31.3	60.2	44.7
SKU-155	11.8	12.8	32.5	10.8	47.5	23.2

^aData represent means of 10 replications of each treatment. The experiment was repeated three times. Disease severity was rated 10 days after inoculation with *R. solanacearum*. Biocontrol efficacy is based on comparisons to the nonbacterized but pathogen-challenged controls.

^bPepper and tomato seeds were coated with the selected bacterial cell suspension and planted.

^cPlants were grown in potting soil and was drenched with bacterial cell suspension.

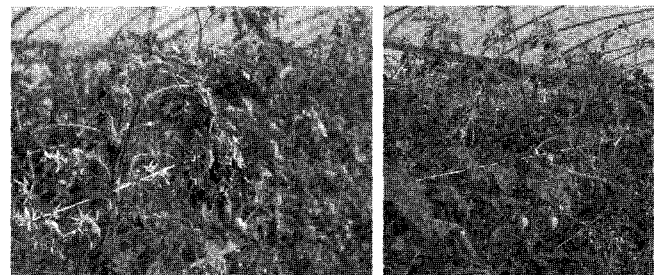
Table 3. Survival of *Ralstonia solanacearum* in soil after application of SKU-78 strain

Days after treatment	CFU/g of fresh soil ^a
0 day (first treatment)	5×10^7
10 days (second treatment)	2×10^4
20 days	1×10^3
30 days	1×10^3
40 days	1×10^3

^aValue for bacteria was determined on King's B medium. Value is mean of three replicates.

않았다. 선발균주 현탁액을 종자에 코팅처리, 토양에 관주처리, 그리고 종자처리와 토양처리를 병행한 경우의 발병억제효과를 활성균주의 처리 없이 *R. solanacearum* 만 처리한 대조구에 대한 발병 억제율로 나타내었으며, 각 처리마다 토마토와 고추를 각각 10주 씩 3번 반복 실험하여 평균값을 구하였다(Table 2). 모든 활성균주에 있어서, 토양처리 방법이 종자처리 방법 보다 발병억제 효과가 좋고, 종자 또는 토양의 단독 처리보다 종자 처리와 토양처리를 병행한 경우에 방제효과가 높게 나타났다. 특히 SKU-78 균주의 경우 종자처리와 토양처리를 병행한 경우 60% 이상의 발병 억제율을 나타내었다.

2) 포장 실험: 선발된 활성균주 중 포트실험에서 고추와 토마토 둘 다에 대해 풋마름병 방제효과가 가장 뛰어난 SKU-78 균주에 대해 포장실험을 실시하였다. 풋마름병에 감염된 토마토 포장에 SKU-78 균체 현탁액을 40배 희석하여 처리하였으며 1차 처리 10일 후 배양액을 200배 희석하여 다시 2차 처리를 실시하였고, 10일 간격으로 토양 내 *R. solanacearum*의 밀도의 변화, 그리고 발병 식물체의 회복여부를 조사하였다. SKU-78 균주의 현탁액을 토양에 처리하는 것에 의해 토양의 *R. solanacearum*의 밀도가 점차 감소함을 알 수 있었으며(Table 3),



(a) Before treatment

(b) After treatment

Fig. 1. Efficacy of SKU-78 strain in suppression of bacterial wilt of tomato. (a) spread of *R. solanacearum* infection, (b) showed healthy growth after treatment of SKU-78 strain in contrast with the appearance of severe wilt symptoms in nontreated tomato plants (a).

2차 처리 후 20일이 경과한 후에 발병식물체가 확연하게 회복됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

SKU-78 균주의 항균활성. SKU-78 균주의 항균활성을 paper disc method로 조사한 결과 Gram 음성균인 *Salmonella gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Gram 양성균인 *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus aureus*, yeast 인 *Saccharomyces cerevisiae* 모두에 대해 저해 활성이 없으나, fungi인 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*에 대해서는 강한 활성을 나타내었다.

SKU-78 선발균주의 동정. 선발균주 SKU-78을 동정하기 위하여 세포와 포자의 형태, catalase, oxidase, urease, protease, lipase, nitrate reductase, amylase와 cellulase 등의 여러 효소의 생산 여부, 탄소원의 이용, citrate 이용, Voges-Prokauer 반응 등을 조사하였다(Table 4). SKU-78 균주는 Gram 양성으로, 생화학적 특성에 의해 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* group으로 분류되었으며 또한 16S rDNA의 염기서열을 분석하

Table 4. Characterization of SKU-78 strain

Morphological characteristics	
Gram reaction	+
Motility	-
Biochemical characteristics	
Catalase reaction	+
Gas production from glucose	+
H ₂ S production	-
Methyl red test	-
Voges Proskauer	+
Oxidase reaction	-
Urease activity	+
Citrate utilization	+
Nitrate reduction to nitrite	+
Amylase activity	+
Protease activity	+
Cellulase activity	+
Lipase activity	+
Phytase activity	+

고 Database를 이용하여 유사도를 조사한 결과 SKU-78 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 유사성을 보여 *Bacillus* sp. SKU-78로 명명하였다. SKU-78 균주는 amylase, protease 그리고 glucanase 등의 고분자 가수분해 효소를 분비함과 동시에 또한 extracellular phytase 활성도 나타내었다.

고 찰

토마토와 고추의 근권토양에서 분리한 미생물을 대상으로 뿌리의 생장촉진 효과가 크고 뿌리에 colonization이 수월한 PGPR 균주 6종을 선발하여 pot 실험에서 종자 coating 처리와 토양 관주 처리 모두에서 강한 꽃마름병 발병 억제 효과를 보이는 SKU-78 균주에 대해 포장실험을 실시하여 생물농약으로서의 개발 가능성을 확인하였다. SKU-78 균주에 의한 꽃마름병의 발병억제 기작이 정확하게 밝혀지진 않았지만 *in vitro* plate 상에서 꽃마름병균에 대해 저해활성을 나타내지 않으므로 직접적인 antibiosis에 의하지 않음을 알 수 있다. PGPR 균주 중에 식물 병원균에 대해 직접 antibiosis를 나타내지 않으나, 식물 뿌리에 근착되어 토양 유래 병원균에 대한 식물의 저항성을 유도하기도 하는데 이를 induced systematic resistance(ISR)라 한다.⁹⁾ 이와 같이 비 병원균에 의해 유도된 저항성은 병원균에 의한 pathogen induced systemic acquired resistance(SAR)와 마찬가지로 발병을 억제시키기는 하지만 SAR 같이 salicylic acid와 pathogenesis-related protein(PR protein)의 축적은 이루어지지 않고 독특한 신호전달 체계에 의한다고 밝혀졌다.¹⁰⁾ PGPR 균주는 뿌리에 근착되어 병원균 침입 시 뿌리에 callus와 pectin 생성을 유도하거나¹¹⁾ 또는 신속한 lignification과 peroxidase와 superoxide dismutase 활성의 증가 등 식물체 내 생리적인 반응을 가져온다는 보고가 있으며,¹²⁾ 일단 PGPR 미생물에 의해 식물체에 ISR이 활성화되면 넓은 스펙트럼의 병원균들에 대한 저항성이 오랫동안 유지된다고 알려졌다.¹³⁾ SKU-78 균주에 의한

꽃마름병 발병 억제기작이 ISR의 유도에 의한 것인지의 확인은 SKU-78 균주에 의한 꽃마름병균 외의 다른 병원균에 의한 발병의 억제 여부에 대한 검정을 통해 이루어질 수 있겠다.

고추의 경우 역병과 꽃마름병의 발병 초기증상이 유사하여 진단이 불가능하여 초기 방제의 어려움이 있는데, SKU-78 균주는 *in vivo*에서 강한 꽃마름병 발병 억제효과를 나타낼 뿐만 아니라 고추 역병균에 대해서는 강한 항균활성을 나타내므로 역병과 꽃마름병 모두의 초기 방제제로 사용 가능할 뿐만 아니라 extracellular phytase 활성을 가져 불용성 인산을 가용화 시킬 수 있는 미생물이다. Extracellular phytate를 분해할 수 있는 근권 미생물은 토양 내 가용성 인산 부족 시 식물생장을 촉진할 수 있는 미생물 인산 비료로서 농업 생산성을 높일 수 있다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 식물 뿌리에의 근착 능력이 PGPR 미생물에 있어서 토양유래 병원균의 억제를 위한 가장 중요한 요건이라 할 수 있다.¹⁵⁾ *Bacillus* strain의 경우 포자를 형성하여 오랫동안 생존활성을 유지할 수 있을 뿐만 아니라, 온도, pH와 농약 등에 대해서도 강하여 상업적으로 사용되는 생물학적 방제제가 대부분 *Bacillus*속에 속하긴 하나 *Bacillus*속은 일반적으로 뿌리에 잘 근착되지 않는다는 문제점이 있다. 그러나 SKU-78 균주는 근착성도 아주 양호하여(결과 미제시) 생물농약으로의 개발 잠재성이 아주 높다고 판단된다.

환경오염과 독성문제가 크게 부각되면서 화학농약의 대안으로 생물학적 방제제로서의 미생물 사용에 대한 관심이 높아지고 있으나 미생물 제제의 경우 활성스펙트럼이 좁고, 포장에서의 효과가 환경요인에 따라 변이가 심할 뿐만 아니라, shelf life 즉 저장 시 충분한 생존밀도가 유지되는 기간이 짧다는 문제점이 상업적 이용에 걸림돌로 작용하고 있다. 특히 단일 병원균에 대한 단일 길항미생물 제제를 사용하면 이 미생물이 모든 토양 조건에서 그리고 병원균의 모든 race에 대해 활성을 나타내기가 힘들므로 재현성 있는 결과를 기대하기가 어려운 것이 사실이다.¹⁶⁻¹⁷⁾ 변이가 특히 심한 꽃마름병균 *Ralstonia solanacearum*의 효과적 방제를 위한 전략으로 높은 밀도의 단일 미생물 제제보다 발병억제 기작과 뿌리 근착을 위한 최적조건(온도, pH, 습도 등)이 서로 다르면서 서로에 대해 친화적인 미생물들의 복합체 구성과 생균의 밀도 유지를 위한 제제화 연구가 진행 중에 있다.

초 록

종자발아실험과 뿌리에서의 집락 형성실험으로 고추와 토마토의 근권 토양에서 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) 균주를 선발하였다. 그 중 포트실험에서 종자처리와 토양 관주처리 하였을 때 60% 이상 꽃마름병 방제효과를 나타낸 SKU-78 균주에 대해서 포장에서의 방제효과 검증에 의해 생물농약으로의 개발 가능성을 확인하였으며, 생화학적 특성조사와 16S rDNA sequence 분석에 의해 SKU-78 균주를 *Bacillus* sp. SKU-78로 동정하였다.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, 꽃마름병, PGPR, ISR, 생물학적 방제제

감사의 글

본 연구는 농림기술개발 연구과제로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 풋마름병원균을 분양해주시고 여러 조언을 해주신 농업과학기술원의 이영기 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Van Elsas, J. D., Kastelein, P., Van Bekkum, Van der Wolf, J. M., de Vries, P. M. and Van Overbeek, L. S. (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* **90**, 1358-1366.
2. Van Elsas, J. D., Kastelein, P., de Vries, P. M. and Van Overbeek, L. S. (2001) Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in irrigation water. *Can. J. Microbiol.* **47**, 842-854.
3. Vasse, J., Frey, P. and Trigalet, A. (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomona solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* **8**, 241-251.
4. Van Elsas, J. D., Kastelein, P., de Vries, P. M. and Van Overbeek, L. S. (2001) Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in irrigation water. *Can. J. Microbiol.* **47**, 842-854.
5. Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. and Samilyappan, R. (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* **20**, 1-11.
6. Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**, 885-886.
7. Bakker, P., Ran, L., Pieterse, C. and Van Loon, L. (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.* **25**, 5-9.
8. Ownley, B.H., Weller D.M. and Thomashow, L.S. (1992) Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology* **82**, 178-184.
9. Van Loon L., Bakker P. and Pieterse M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453-483.
10. Pieterse, C. M. J., Van Wees S. C. M., Hoffland, E., Van Pelt J. A. and Van Loon L. C. (1996) Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237.
11. Benhamou, N., Kloepper, J. W., Quadt-Hallman, A. and Tuzun, S. (1996) Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.* **112**, 919-929.
12. Jetiyan, K., Tuzun, S. and kloepper, J. W. (1997) In *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future prospects*, Nakanishi printing, Sapporo, Japan, pp. 265-268.
13. Idriss E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriess, R. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth promoting effect. *Microbiology* **148**, 2097-2109.
14. Handelsman, J. and Stabb, E. (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**, 1855-1869.
15. Parke, J. (1991) In *the rhizosphere and plant growth, Root colonization by indigenous and introduced microorganism*, Kluwer Academic Publishers, pp. 33-42.
16. Backman, P. A., Wilson, M. and Murphy, J. F. (1997) In *Environmentally safe approaches to crop disease control*, CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 95-109.
17. Jetiyanon, K. and Kloepper, J. W. (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant disease. *Biol. Control* **24**, 285-291.